

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. G. W. Löhr

ENZYMAKTIVITÄTSCHEMMENDE
ANTIKÖRPER GEGEN
TRANSAMINASEN AUS HUMANORGANEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dietrich Schneider
aus Marburg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153305_0021

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Marburg

Direktor: Prof. Dr. G. W. Löhr

ENZYMAKTIVITÄTSHEMMENDE
ANTIKÖRPER GEGEN
TRANSAMINASEN AUS HUMANORGANEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dietrich Schneider
aus Marburg

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 9.7.1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. N. Lang

Correferent: Prof. Dr. G.-W. Löhr

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Methodik	3
1.) Herstellung der Organextrakte	
2.) Säulenchromatographie	
3.) Immunisierung, Antiserumgewinnung, Antiserumlagerung	
4.) Enzymaktivitätsbestimmung	
5.) Inkubationsbedingungen der Enzymaktivitätsbestimmung	
C. Ergebnisse	7
1.) Untersuchungen zur Enzym- u. Antikörperkinetik	7
a.) Abhängigkeit der Hemmung von der Inkubationszeit	
b.) Abhängigkeit der Hemmung vom Antiserumangebot	
c.) Substratabhängigkeit der Enzymaktivitätshemmung	
2.) Untersuchungen zur Organspezifität der Antiseren	13
3.) Untersuchungen zur Isoenzympezifität der Antiseren	13
4.) Untersuchungen über immunologische Speziespezifität	14
5.) Autoimmuneigenschaften der Antiseren	17
6.) Zentrifugationsversuche	18
D. Diskussion	23
E. Zusammenfassung	29
F. Literaturverzeichnis	31

A. Einleitung und Fragestellung

Aufgabe der Arbeit war es, die enzymaktivitätshemmenden Eigenschaften von Antikörpern gegen Human-Herz- und Human-Leber-Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen der mitochondrialen, sowie cytoplasmatischen Fraktion zu untersuchen.

Von besonderem Interesse waren dabei die Auswirkungen der Substratkonzentrationen, die Organ-, Species- wie auch Isoenzym-spezifität der Antikörper, sowie Fragen der Sedimentierbarkeit von Enzymantikörperkomplexen. Weiterhin waren die optimalen Versuchsbedingungen bezüglich Antiserummenge, Inkubationsdauer und -temperatur zu ermitteln.

In der Literatur sind bereits eine Vielzahl experimentell erzeugter Antikörper mit enzymaktivitätshemmenden Eigenschaften bekannt. Nachdem J. Sumner 1926 (47) als erster ein Enzym in Form eines Proteinkristallisates isoliert hatte, beschrieben J. S. Krik und J. Sumner 1931 (21) hemmende Antikörper gegen die Urease einer Bohnensorte. Schon 1930 hatte J. H. Northrop (40) präzipitierende Antikörper gegen Schweinepepsin beschrieben. Die 1929 von L. Stern und F. Batelli (45) beobachtete Hemmung der Katalaseaktivität beruhte nicht auf experimentell erzeugten, sondern auf normalerweise in verschiedenen Tiergeweben vorkommenden Antikörpern.

In der Folgezeit sind zahlreiche Antikörper gegen die verschiedensten Enzyme hergestellt worden. Sie hatten präzipitierende und enzymaktivitätshemmende Eigenschaften oder besaßen jeweils nur eine dieser Eigenschaften, wie zum Beispiel die Urease-Anti-

körper nur hemmten (21) oder die Antikörper gegen alkalische Phosphatase nur präzipitierten (3).

Erzielt wurden Antikörper gegen Papain (13), Trypsin (16), Tyrosinase (1), das reduzierende Gärungsferment (23), d-Ribonuclease (43,44), Pankreas- und Streptokokken-Desoxyribonuclease (5,6,14), Lipase (52), Lecuthinase (7,51), d-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (22,49), Amylase (9,10,29), Alkoholdehydrogenase (37), Laktatdehydrogenase (LDH) verschiedener Species (12, 19,32,36,38,39), Elastase (18), Phosphohexose-Isomerase (38), Carboxylphosphat-Synthetase (31), Penicillinase (41), Adenylsäure-Desaminase, Kreatinkinase und Kreatin-ATP-Transphosphorylase (42), Tryptophan-Synthetase (47,49,50), Xanthinoxidase (48), alkalische Phosphatase (3), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (4), Proteinase und Diphospho-Pyridin-Nucleotidase (13), Tyrosin- α -Keto-Glutarat-Transaminase (20) und schließlich gegen β -Galactosidase (8).

B. METHODIK

1.) Herstellung der Organextrakte

Die Organgewebe von Schwein, Rind, Ratte und Kaninchen wurden sofort post mortem in aqua dest. 2 - 3 min im Eisbad mit dem Messerhomogenisator Ultra-Turax (Fa. Janke u. Kunkel) homogenisiert (jeweils 1 g Gewebe in 5 ml Aqua dest.) und das Homogenat 20 min bei 15000 U/min, 16000 g und 0°C zentrifugiert. Der weiter verwendete Überstand dialysierte dann anschließend 24 Std. gegen 0,008 M Phosphatpuffer (pH 7) bei 4° C.

Das Dialysat wurde nochmals 20 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann 80 ml auf die Chromatographiesäule gegeben. Die Humanorgane wurden aus dem Sektionsgut maximal 24 Std. post mortem gewonnen.

2.) Säulenchromatographie

Zur chromatographischen Trennung der M- und C-GOT wurde DEAE-Sephadex von Pharmazia Uppsala (Qualität A 50 middle coarse) verwendet. Je nach Menge des aufgetragenen Extraktes wurden 100 - 200 ml Sephadex verwendet, das nach Vorschrift vorbereitet wurde (Quellen in H₂O, Übergießen von 0,5 n HCL, Nachspülen von H₂O und Quellen lassen, trocken laufen lassen; mehrmaliges Nachspülen und auf pH 7 Einstellen mit Phosphatpuffer 0,008 M). Die Elution wurde diskontinuierlich nach Hess und Walter (15) bei einer Temperatur von ca. 4° C durchgeführt.

Die mitochondriale GOT-Fraktion wurde mit 0,008 M Puffer (= Lösung 1) ausgewaschen, die cytoplasmatische GOT-Fraktion mit 0,05 M und 0,07 M Puffer (Lösungen 4 und 5) gewonnen.

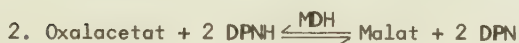
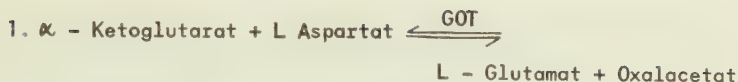
3.) Immunisierung, Antiserumgewinnung, Antiserumlagerung

Zur Immunisierung wurde säulenchromatographisch angereicherte mitochondriale GOT (M-GOT) und cytoplasmatische GOT (C-GOT) verwendet. Zwei Kaninchen erhielten Human-Herz-M-GOT, zwei Human-Leber-M-GOT bzw. C-GOT in Abständen von 4 Tagen 4 mal intraperitoneal injiziert. Die Injektionslösungen hatten einen Eiweißgehalt von 1,5 mg und wurden zusammen mit etwa 0,5 ml einprozentigem Aluminiumhydroxydgel als Adsorbens gegeben. Dieser Zusatz von Adjuvans steigert die Antikörperbildung (11). Die Enzymaktivität der GOT-Injektionslösungen betrug ca. 10 IU/mg Protein. Die Antiseren wurden von der 3. Woche nach Immunisierungsbeginn an über längere Zeit gewonnen und gemischt. Die Kaninchen erhielten über diese Zeit Auffrischungsimpfungen. Die Seren wurden unter Zusatz von Spuren Natriumazid (NaN_3) bei -20°C in kleinen Mengen (jeweils 5 ml) gelagert und vor Gebrauch bei 4°C und 5000 U/min abzentrifugiert.

4.) Enzymaktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivitätsbestimmung der GOT-Isoenzyme erfolgte im optischen Test mit Malatdehydrogenase als Hilfsenzym.

Reaktionsgleichungen:



Die Messung erfolgte im Photometer Eppendorf bei 366 μm und 25° C in der Meßkuvette $d = 1$; das Endvolumen von 1 ml bei allen Reaktionen wurde durch komplementäre Zugabe von Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,5 hergestellt. Der Start der Reaktion erfolgte nach Berücksichtigung des unspezifischen Vorlaufes mit l-Aspartat. Die Enzymaktivität wird in internationalen Einheiten angegeben (1 mU = 1 nM Substratumsatz pro Minute).

	M - GOT	C-GOT
DPNH	$4,24 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4,24 \times 10^{-3} \text{ M}$
KGS	$2 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$
MDH	etwa 370 mn/ml	etwa 370 mn/ml
l - Aspartat	$2 \times 10^{-2} \text{ M}$	$5 \times 10^{-2} \text{ M}$

Tab. 1 (Die hier angegebenen Substratkonzentrationen wurden aus weiter hinten angeführten Versuchen über die Substratabhängigkeit der Enzymaktivität ermittelt).

5.) Inkubationsbedingungen der Enzymaktivitätsbestimmung

Für die immunologischen Untersuchungen wurden chromatographisch angereicherte Fraktionen aus frisch aufbereiteten Organgeweben verwendet. Bei den Versuchen zur Organ- und Speciespezifität wurden 120 mU und 60 mU M- oder C-GOT mit entsprechenden Mengen AS inkubiert. Die Messungen begannen nach einer Inkubation von ca. 30 Min. und waren nach etwa 5 Std. beendet. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur.

In Versuchen mit dem AS 3 (Anti-Humanleber-M-GOT-Serum) wurde unter Konstanthaltung der Relation Enzymaktivität : Antiserummenge nur die Hälfte der Enzym- und Antiserummenge bei gleichem Inkubationsvolumen inkubiert.

Während der Inkubation trat keine sichtbare Präzipitation auf; vor Beginn der Messung wurde gut durchgemischt.

C. E R G E B N I S S E

1. Untersuchungen zur Enzym- und Antikörperkinetik

a) Abhängigkeit der Hemmung von der Inkubationszeit

Um die Abhängigkeit der Hemmung von der Inkubationszeit zu untersuchen, wurden konstante Mengen Enzym und Enzymantiserum inkubiert. Die Inkubationszeit variierte dabei zwischen 30 Sekunden und 16 Stunden. Dabei wurden bei den verwendeten Antiseren (wie im Beispiel der Abb. 1) durchschnittlich nach etwa 1 Min. Inkubation bereits annähernd 55 % der Enzymaktivität gehemmt, nach ca. 5 Min. 76 % und nach 10 Min. etwa 79 %. Nach ca. 16 Std. betrug die Hemmung etwa 81%. Man hatte also schon nach ca. 10 Min. eine nahezu maximale Hemmung.

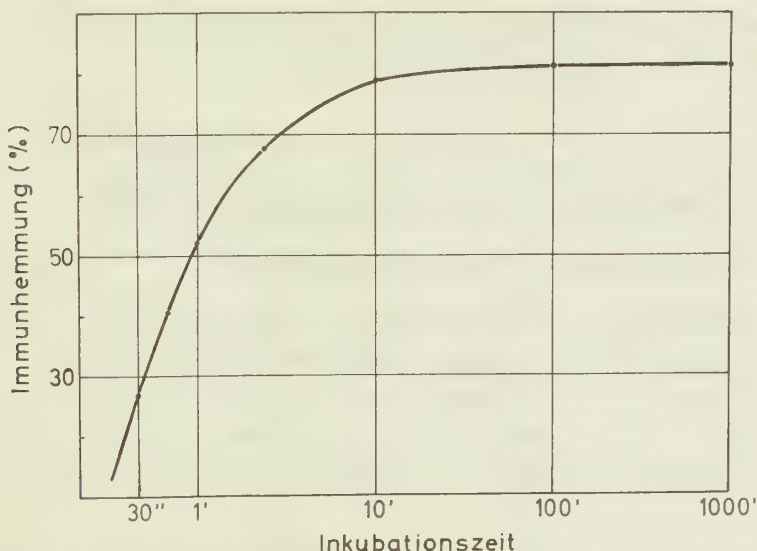


Abb. 1: Immunhemmung (Ordinate) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abszisse)

b) Abhängigkeit der Hemmung vom Antiserumangebot

In diesen Versuchen wurde diejenige Menge an Antiserum (AS) gesucht, die eine bestimmte Menge des korrespondierenden GOT-Isoenzyms maximal hemmt. Dies war notwendig, um eine vergleichende Aussage zu erhalten über die Hemmung eines Isoenzyms aus verschiedenen Organen einer Species (=Organspezifität) oder die Hemmung dieser Enzyme gleicher Organe verschiedener Species (=Speciespezifität). Dazu wurde eine konstante Enzymaktivität (in mU) mit einer steigenden Menge AS inkubiert und im Enzymsubstrattest gemessen.

Ergebnis (s. Abb. 2): Die für eine maximale Hemmung benötigte AS-Menge war bei den mit M-GOT immunisierten Kaninchen größer als bei den mit C-GOT immunisierten. Das AS 3 (=Antihumanleber M-GOT Serum) hemmte so schwach, daß bei Versuchen mit diesem Antiserum nur die halbe Menge an Enzym inkubiert wurde, um doch noch die maximal mögliche Hemmung zu bekommen.

Um 120 mU (bei AS 3 60 mU) maximal zu hemmen, benötigte man folgende Mengen an Antiserum (entspricht Versuchsbedingung $\frac{U}{1}$; $\frac{U}{2}$ entspricht der Hälfte dieser Antiserummenge):

AS 1 : 0,30 ml, entspr.	$\frac{U}{1}$;	0,15 ml entspr.	$\frac{U}{2}$
2 : 0,30 " "	$\frac{U}{1}$;	0,15 " "	$\frac{U}{2}$
3 : 0,40 " "	$\frac{U}{1}$;	0,20 " "	$\frac{U}{2}$
5 : 0,16 " "	$\frac{U}{1}$;	0,08 " "	$\frac{U}{2}$
6 : 0,20 " "	$\frac{U}{1}$;	0,1 " "	$\frac{U}{2}$
7 : 0,24 " "	$\frac{U}{1}$;	0,12 " "	$\frac{U}{2}$
8 : 0,26 " "	$\frac{U}{1}$;	0,13 " "	$\frac{U}{2}$

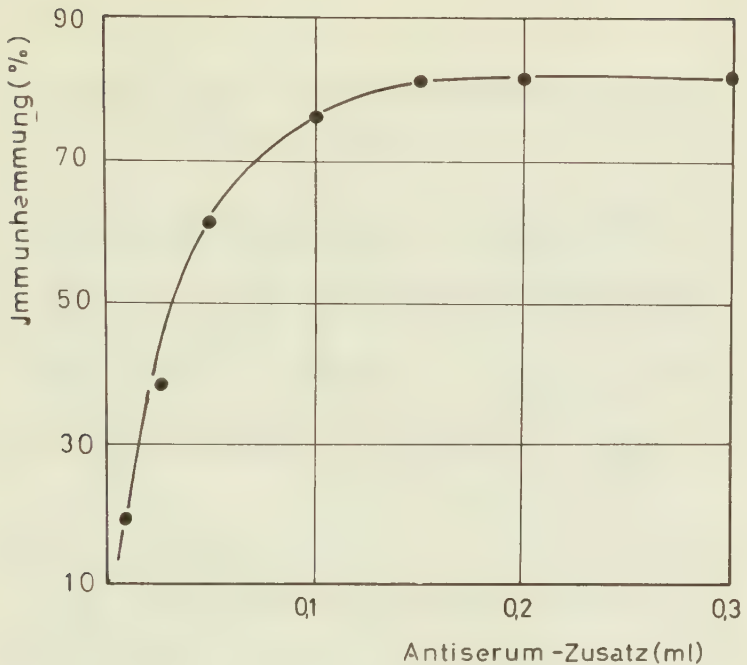


Abb. 2: Enzymhemmung (Ordinate) in Abhängigkeit von der Antiserumkonzentration (Abszisse), hier z.B. AS 7

c) Substratabhängigkeit der Enzymaktivitätshemmung

Um optimale Meßbereiche (möglichst Kurvenplateau mit nur geringer Änderung der Enzymaktivität und Enzymhemmung bei variablem Substratangebot) in den Enzymaktivitätsbestimmungen zu haben, wurde jeweils eine konstante Menge Enzym und Enzymantikörper mit steigender Menge Substrat inkubiert und wie vorher beschrieben im Enzymsubstratttest gemessen.

Dabei fand sich, daß die Kurven der Enzymaktivität und die Kurven der Immunhemmung in % der Enzymaktivität ohne Anti-

serumzusatz spiegelbildlich zueinander sind, d.h., daß die Immunhemmung bei weniger aktiviertem Enzym höher ist.

Auffälligerweise fanden sich Zunahme der Hemmung und Abnahme der Enzymaktivität bei "Substratüberschuß" von α -KGS (wiederholt bestätigt) bei Versuchen von C-GOT mit dem korrespondierenden Antiserum. Die M-GOT-Hemmung durch M-GOT-Antiserum blieb auch bei " α -KGS-Überschuß" annähernd konstant. Bei Überschuß des Substrats Aspartat nahm die Hemmung von C-GOT und auch M-GOT nicht weiter zu und blieb wie die Enzymaktivität in etwa konstant.

Weiterhin wurde die Beobachtung gemacht, daß eine annähernd konstant minimale Hemmung und eine ebenfalls annähernd konstant maximale Enzymaktivierung der mitochondrialen GOT bei wesentlich geringeren Aspartat-Substrat-Konzentrationen gefunden wurden als bei der cytoplasmatischen GOT. In unseren späteren Versuchen wurde daher für M-GOT-Versuche eine geringere Konzentration als für C-GOT-Versuche gewählt. (M-GOT wurde bei 2×10^{-2} M und C-GOT bei 5×10^{-2} M Aspartat gemessen).

Bei α -KGS-Versuchen wurden entsprechend umgekehrte Beobachtungen gemacht: Die für C-GOT Messungen benötigten optimalen Konzentrationen waren geringer (1×10^{-2} M α -KGS) als die bei M-GOT Messungen benötigten (2×10^{-2} M α -KGS). (Siehe Abb. 3 und 4).

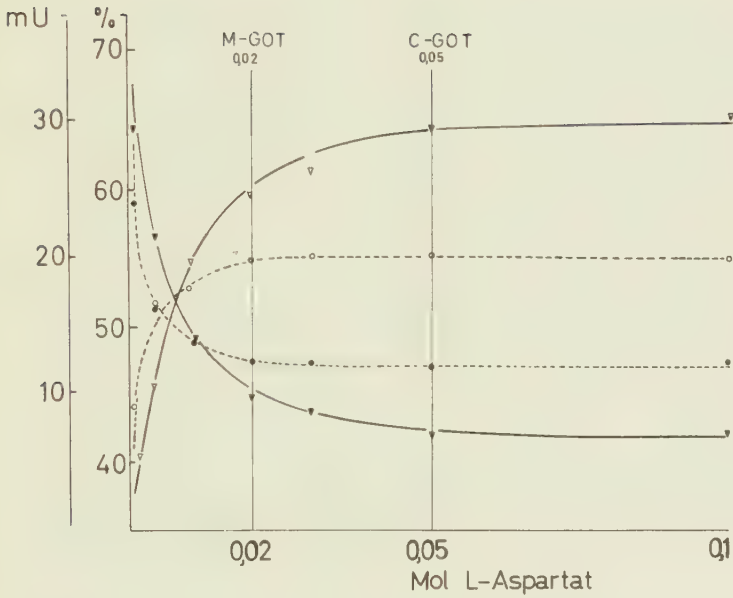


Abb. 3: Enzymaktivität bzw. -hemmung in Abhängigkeit der Substratkonzentration (L-Aspartat)

— ▽ — ▽ — = C-GOT mU, — ▽ — ▽ — = C-GOT % He

--- ○ --- ○ --- = M-GOT mU, --- ● --- ● --- = M-GOT % He

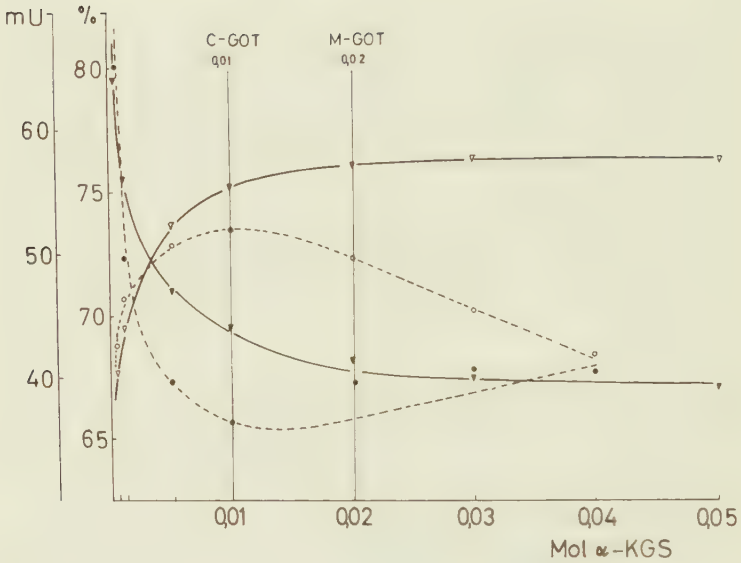


Abb. 4: Enzymaktivität bzw. -hemmung in Abhängigkeit der Substratkonzentration (α -Ketoglutaratsäure)

$\longrightarrow \nabla \longrightarrow$ M-GOT mU, $\longrightarrow \nabla \longrightarrow$ M-GOT % He
 $\longrightarrow \circ \longrightarrow$ C-GOT mU, $\longrightarrow \bullet \longrightarrow$ C-GOT % He

2. Untersuchungen zur Organspezifität der Antiseren

Die Frage, ob in den verschiedenen Organen einer Species ein unterschiedliches Enzymmuster vorliegt, ist von großem Interesse. Aus diesem Grunde wurden säulenchromatographisch angereicherte Transaminasen verschiedener Organe mit jeweils der gleichen Menge Antiserum inkubiert und die verbliebene Restaktivität gemessen. Die Versuche waren so vorbereitet, daß jeweils gleichalte Säulenextrakte der Humanorgane Herz, Leber, Muskel, Niere und Hirn innerhalb von 5 Stunden mit jeweils einem Antiserum durchgetestet wurden. Diese Versuche wurden später auf die Organextrakte von Herz und Leber bei Rind, Ratte, Schwein und auch Kaninchen ausgedehnt. Sie wurden in den Antiserumkonzentrationen $\frac{U}{1}$ und $\frac{U}{2}$ (Antiserummenge zur maximalen Hemmung von 120 mU Enzym bzw. die Hälfte dieser Antiserummenge) durchgeführt, um eventuell vorhandene Unterschiede der Hemmung, die nur bei niedrigerem Antiserumangebot auftreten, nicht zu übersehen.

Die gefundenen Unterschiede der Enzymhemmung verschiedener Organe einer Species waren sehr gering und nicht reproduzierbar, d. h., daß wir eine Organspezifität des Enzymmusters bei Humanorganen mit Hilfe der Immunhemmung im Enzymsubstrattest nicht nachweisen konnten. Die später durchgeführten Versuche mit Herz- und Leberextrakten von Rind, Schwein, Ratte und Kaninchen ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Immunhemmung.

3. Untersuchungen zur Isoenzympezifität der Antiseren

Um eine Aussage über die Kreuzhemmbarkeit der beiden Isoenzyme

zu erhalten, wurden bei sämtlichen Versuchen zur Organ- und Speciesspezifität die säulenchromatographisch getrennten Isoenzyme sowohl mit Anti-M-GOT-Seren als auch mit Anti-C-GOT-Seren getestet. Dabei fand sich in nur seltenen Fällen eine fragliche Kreuzreaktion der Hemmung des jeweiligen Isoenzym von maximal 15 - 20 %, die jedoch in konstant war.

Es zeigten sich also neben den säulenchromatographischen Unterschieden Verschiedenheiten in der Kinetik und auch in der immunologischen Hemmbarkeit der beiden Isoenzyme.

4. Untersuchungen über immunologische Speciesspezifität

Zur Bestimmung der Speciesspezifität inkubierten wir eine jeweils konstante Menge an M-GOT und C-GOT der verschiedenen Species mit den Antiseren 1 - 8 (= Human-Leber- bzw. -Herz-M-GOT- und C-GOT-Antiserum) in den früher angegebenen Mengen $\frac{U}{1}$ und $\frac{U}{2}$ und bestimmten wiederum die verbliebene Restaktivität im Enzymsubstrattest.

Ergebnis: Die Isoenzyme der GOT wurden bei verschiedenen Species gehemmt, allerdings unterschiedlich stark; d.h. die Immunhemmung ist nicht streng speciesspezifisch. Die stärkste Hemmung (H_e) erfolgte erwartungsgemäß bei Human-Transaminasen (1), dann weniger stark bei Ratte (2), Schwein (3), Rind (4) und Kaninchen (5.) (in absteigender Reihenfolge angegeben). Die Aussage beruht auf den Durchschnittswerten aller Meßversuche mit den verschiedenen Antiseren. Dabei fällt die

D. D I S K U S S I O N

Die bei der Immunisierung mit Human-Herz-GOT und Human-Leber-GOT der mitochondrialen wie auch cytoplasmatischen Fraktion erhaltenen Antikörper zeigten eine deutliche und spezifische Hemmung des korrespondierenden Enzyms. In der relativ schnellen, bereits nach wenigen Minuten Inkubationsdauer gefundenen, annähernd maximalen Hemmung zeigte sich eine hohe Antigenaffinität.

Daß jedoch in keinem Falle eine vollständige (100 %ige) Hemmung der Enzymaktivität gefunden wurde, mag daran liegen, daß das Enzymmolekül mehrere determinante Gruppen besitzt, gegen die Versuchstiere unterschiedlich Antikörper bilden. Es könnte somit zu einer Konkurrenz dieser Antikörper kommen, die einerseits direkt gegen das aktive Zentrum und andererseits gegen mehr oder weniger "weit" von diesem Zentrum entfernt liegende Gruppen gerichtet sind. Während die erste Gruppe durch direkten Kontakt mit der enzymatisch aktiven Stelle des Enzymmoleküls stets zu einer Inaktivierung führt, kann die zweite Gruppe nur teilweise über eine sterische Änderung der Enzymkonfiguration oder durch Behinderung des Substratzutrittes an die enzymatisch aktive Stelle des Enzymmoleküls zu einer Inaktivierung führen. Ein Teil der Antikörper wird bei seiner Reaktion mit dem Antigen weder zu einer Behinderung des Substratzutrittes noch zu einer Änderung der sterischen Enzymkonfiguration und somit zu keiner Inaktivierung führen. Diese Ansicht wird durch die Zentrifugationsversuche bestätigt. Nach Zentrifugieren fand sich in verschiedenen Versuchen eine fast vollständige "Hemmung" von 99 %, ein Zeichen dafür, daß wahrscheinlich noch enzymatisch aktive Enzym-Enzymantikörper-Komplexe sedimentiert werden. Daß es

sich hier auch um ein Abzentrifugieren von enzymatisch aktiven Enzympolymerisaten oder von aktiven, an Enzym-Enzymantikörperkomplexen angelagerten, nicht immunologisch gebundenen Enzymmolekülen handeln kann, ist nicht auszuschließen. Eine weitere Ursache der unvollständigen Enzyminaktivierung kann in einer Konkurrenz zwischen Substrat und Antikörper gesehen werden. So wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen unter konstanten Antiserumbedingungen unterschiedlich hohe Enzyminaktivierungen festgestellt. Auffällig war eine sehr hohe Hemmung bei Substratunterangebot und eine wesentlich niedrigere Hemmung der Enzymaktivität bei "Substratüberangebot" von α -Ketoglutaratsäure und L-Aspartat in M- wie auch in C-GOT Versuchen. Massarrat und Lang (33) fanden bei Vorinkubation von GOT und den Substraten α -Ketoglutaratsäure und L-Aspartat keinen Einfluß auf die Höhe der Immunhemmung bei Vorinkubation von Antiserum mit den genannten Substraten unter späterem Hinzufügen des Enzyms. Sie deuteten diese Befunde dahingehend, daß keine wesentliche Konkurrenz von Substrat und Antikörper um das Enzymmolekül vorliegen könne.

In den Versuchen zur Isoenzympezifität zeigte sich weder bei der Inkubation von M-GOT mit C-GOT-Antiseren noch bei der Inkubation von C-GOT mit M-GOT-Antiseren eine Kreuzreaktion. Die Antiseren waren isoenzymspezifisch. Ebenfalls für das Vorliegen einer Isoenzymspezifität sprechen die in den Vorversuchen gefundenen unterschiedlichen Substratoptima. Zu den gleichen Untersuchungsergebnissen kamen auch andere Autoren. So beschrieben NACE (36) Antikörper gegen Frosch-LDH-Isoenzyme und LANG u. MASSARRAT (27) Antikör-

per gegen Schweineherz-GOT-Isoenzyme mit Isoenzymspezifität. Antikörper gegen Rinder-LDH-Isoenzyme (32) oder Hühner-LDH-Isoenzyme (19) dagegen zeigten deutliche Kreuzreaktionen untereinander, waren also nicht isoenzymspezifisch.

Im Gegensatz zur Isoenzymspezifität fand sich kein Hinweis auf Organspezifität. Die früher von MASSARRAT u. LANG (35) angenommene relative Organspezifität der GOT konnte durch die gleichen Autoren durch unterschiedliche Isoenzymzusammensetzung der Organextrakte erklärt werden (27,29). Lediglich bei Rinderpankreas-Ribonuclease-Antikörpern (44), die keine Kreuzreaktion mit Rinderserum-Ribonuclease-Antikörpern zeigten und bei Antikörpern gegen alkalische Phosphatase aus Human- und Hunde-Darmtrakt (38), die mit den gleichen Enzymen anderer Organe nicht reagierten, zeigte sich eine Organspezifität. Antikörper gegen Amylase (9,10) LDH (12,38,39), Xanthinoxidase (48) u. a. m. ließen ebenfalls keine Organspezifität erkennen.

In den Versuchen zur Speciesspezifität konnte keine absolute Spezifität festgestellt werden. Es fand sich jedoch eine relative Speciesspezifität. So wurde die Enzymaktivität aus Schweine- und Rattenorganen sehr stark und die aus Rinderorganen weniger stark, jedoch noch fast zu 50 % gehemmt. Außerdem wurde eine Kreuzreaktion mit den Enzymen der Kaninchenorgane gefunden, die in der mitochondrialen Fraktion etwa doppelt so stark war wie in der cytoplasmatischen (vgl. Abt. 5). Die gefundenen Antikörper besaßen somit Autoantikörpereigenschaften. In der Literatur sind bereits eine

Vielzahl solcher nicht speciesspezifischer Enzymantikörper beschrieben (vgl. Tab. 15 in 16), die eine Kreuzreaktion mit den Enzymen anderer Spezies zeigten.

Interessanterweise fand sich bei den Untersuchungen zur Speciesspezifität bei gleichstarker Hemmung der Human-Enzyme eine sehr unterschiedlich starke Hemmung der Enzyme anderer Species durch Antiseren verschiedener Kaninchen, die mit ein und demselben Antigen immunisiert wurden. Diese Ergebnisse sprechen wiederum für das Vorhandensein mehrerer Antikörper, die gegen verschiedene antigene Gruppen der Enzymmoleküle gebildet wurden. Für die Existenz mehrerer Isoantikörper sprechen auch die Ergebnisse der Immunelektrophorese wie auch die Doppellinien der OUCHTER-LONY-Tests (vgl. Diss. Penther, H, Marburg 1968).

Die in den Zentrifugations-Versuchen festgestellte Aktivitätsabnahme bzw. scheinbare Mehrhemmung war bei den verschiedenen Species unterschiedlich hoch und zeigte im Sinne der in den Versuchen zur Speciesspezifität gefundenen "Verwandtschaftsfolge" (siehe Abb. 5) eine deutliche Abnahme des Z-Effektes. Die beiden Isoenzyme verschiedener Species zeigen eine Präzipitierbarkeit, die proportional der Hemmbarkeit der Enzymaktivität ist. Diese Ergebnisse sprechen somit für Hemmung und Präzipitation durch ein und denselben Antikörper. Daß der Zentrifugations-Effekt bei den Hemmversuchen von Human-GOT in der Antiserum-Konzentration $\frac{U}{T}$ nicht so groß war wie bei der Species Ratte, liegt, wie schon vorher beschrieben, an den Versuchsbedingungen: Bei der Antiserumkonzentration $\frac{U}{T}$ war z.T. bereits vor Zentrifugieren eine sehr starke Immunhemmung der Enzymaktivität von etwa 95 %

festzustellen. Der somit noch mögliche Zentrifugations-Effekt hätte also nicht größer als maximal 5 % sein können.

Zum Schluß sollen noch einige Überlegungen über die Enzym-Enzymantikörper-Bindung und über die Enzyminaktivierung angestellt werden. Die Zentrifugation des Inkubats von Enzym + Enzymantikörper ergab einen Niederschlag, der eine deutlich meßbare Enzymaktivität enthielt. Dieses Untersuchungsergebnis spricht für das Vorkommen auch solcher Antikörper, die nicht gegen die aktive Gruppe des Enzymmoleküls gerichtet sind. Die gemessene Aktivität konnte durch Kopräzipitation (Anlagerung von Enzymmolekülen an Enzym-Enzymantikörper-Komplexe) sowie durch die Aktivität präzipitierter Enzympolymerisate hervorgerufen werden. Die nach Zugabe von AAS (= Hammelantiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin, nämlich "Anti-Antiserum") zu beobachtende Enzymaktivitätsabnahme spricht für vorher vorhandene, auf Grund der Immunbindung entstandene aktive Enzym-Enzymantikörper-Komplexe, die durch die Enzymantiserum-AAS-Reaktion eine sterische Änderung des immunologisch gebundenen Enzymmoleküls oder eine Behinderung des Substratzutrittes erfahren. Daß es sich hierbei jedoch nicht nur um diese sterische Änderung oder Substratbehinderung des immunologisch gebundenen Enzymmoleküls handelt, zeigen die Versuche nach nochmaligem Zentrifugieren.

Hierbei kommt es zu einem Anstieg und nicht - wie erwartet - zu einer weiteren Abnahme der Enzymaktivität. Es werden also keine - wie vorher beschrieben - durch Anlagerung entstandene Enzym-Enzym-Enzymantiserum-AAS-Komplexe abzentrifugiert, sondern es wird allenfalls ein "Loslasseffekt" erreicht. Es

könnte sich somit um das Freiwerden von, wie oben beschrieben, angelagerten Enzymmolekülen mit durch die Anlagerung veränderter Sekundärstruktur und dadurch bedingter Enzym-inaktivierung gehandelt haben, zumal dieser Enzymaktivitätsanstieg bei der Inkubation von KS-Versuchen mit AAS ebenfalls beobachtet wurde.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Immunisierung mit mitochondrialen wie auch cytoplasmatischen Fraktionen der GOT (M- u. C-GOT) aus Humanorganen (Herz u. Leber) wurden bei Kaninchen Antikörper erzeugt.
2. Diese zeigten bereits nach etwa 10-minütiger Inkubation mit dem korrespondierenden Antigen eine nahezu maximale Enzymaktivitätshemmung. Sie betrug bei entsprechender Antiserummenge bis zu 96 % der Ausgangsaktivität.
3. Die mit M- und C-GOT-Antiseren durchgeführten Hemmversuche zeigten unterschiedliche Substratoptima. Bei Substratunterangebot fand sich eine sehr hohe Hemmung der Enzymaktivität, bei "Substratüberschuß" war die Enzyminaktivierung deutlich schwächer. Es scheint eine Kompetition von Substrat und Antikörper um die aktive Gruppe des Enzyms vorzuliegen.
4. Die Antiseren gegen die chromatographisch getrennten Isoenzyme der GOT hemmten im Enzymsubstrattest nur das korrespondierende Isoenzym; sie waren isoenzymspezifisch. Unterschiede in der Hemmung der Isoenzyme verschiedener Organe konnten nicht festgestellt werden; die gewonnenen Antiseren waren also nicht organspezifisch. Es fanden sich Kreuzreaktionen mit den Enzymen der Species Ratte, Schwein, Rind und Kaninchen. Die Antikörper zeigten somit eine relative Speciespezifität und besaßen Autoimmun-

eigenschaften (Kreuzreaktion mit den Transaminasen der Kaninchen) .

5. Nach Zentrifugieren von Gemischen aus GOT und GOT-Antiseren fanden sich enzymatisch aktive Niederschläge. Die Gabe von Antikaninchen- γ -Globulin vom Schaf zu dem Inkubat von Antiserum und korrespondierendem Antigen bewirkte eine Aktivitätsabnahme, die nach Zentrifugieren nicht noch geringer wurde, sondern - im Gegenteil - eine Enzymaktivitätszunahme im Überstand erkennen ließ. Der Befund läßt sich mit nicht-immunologischer Komplexbildung erklären.
6. Unterschiede in der Hemmung der GOT verschiedener Species durch verschiedene Antiseren gegen die GOT einer Species lassen auf mehrere determinante antigene Gruppen des Enzymmoleküls schließen.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) Adams, H. M.:

The Reaction between the Enzyme Tyrosinase and its
Specific Antibody

J. exp. Med. (1942), 76, 175

2) Arnon, R. and G. E. Perlmann:

Antibodies to Pepsinogen and Pepsinogen Modifications

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 744

3) Boyer, S. H.:

Human Organ Alkaline Phosphatases: Diskrimination by
Several Means including Starch Gel Elektrophoreses of
Antienzyme-Enzyme Supernatant Fluids

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 938

4) Bussard, A. E.:

Reaction Kinetics of the Four-Component System: Glucose-
6-Phosphate Dehydrogenase, Substrate, Coenzyme and Anti-
body Behavior of Serum from Tolerant Rabbits

Ann. N. Y. Sci. (1963), 103 II, 890

5) Mc. Carty, M.:

The Inhibition of Streptococcal Desoxyribonuclease by
Rabbit and Human Antisera

J. exp. Med. (1949), 29, 123

6) Mc. Carty, M.:

Purification and Properties of Desoxyribonuclease Iso-
lated from Beef Pancreas

J. gen. Physiol. (1946), 29, 123

7) Cinder, B. and K. J. Lafferty:

Antibody as Inhibitor of Ribonuclease: The Role of
Steric Hindrance, Aggregate Formation and Specificity

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 653

- 8) Cohn, M. and A. M. Torriani:
J. Immunol. (1952), 69, 471, zit. b. 41
- 9) Mc. Geachin, R. L. and J. M. Reynolds:
Differences in Mammalian Amylases Demonstrated by
Enzyme Inhibition with Specific Antisera
J. biol. chem. (1959), 234, 1456
- 10) Mc. Geachin, R. L.:
Immunochemical Characterization of Amylase Isoenzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1009
- 11) Grabar, P. et C. A. Williams:
Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés
électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de
protéines. Application au sérum sanguin
Biochim. biophys. Acta (1953), 10, 193
- 12) Gregory, K. F. and F. Wroblewski:
Preparation and Properties of Purified Antilactic De-
hydrogenase
J. Immunol. (1958), 81, 359
- 13) Haas, R.:
Biochem. Z. (1940), 305, 280
- 14) Halbert, S. P.:
Naturally Occuring Human Antibodies to Streptococcal
Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1027
- 15) Hess, B. u. J. S. Walter:
Über das Protein der LDH
Kli. Wo. 38, 1080, (1960)
- 16) Hiramatsu, Y.
Jap. 1941, ref, Chem. Zbl. 1942 II,
- 17) Hoeffgen, B.:
Präzipitierende Eigenschaften von Transaminasen-Antikörpern
Diss. Marburg 1965

- 18) Mc. Ivor, B. C. and H. D. Moon:
J. Immunol. (1959), 82, 328
- 19) Kaplan, N. O. and S. White:
Immunological Characteristics of Dehydrogenases
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 835
- 20) Kenney, F. D.:
Immunochemical Analysis of the Induction of Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase in Rat Liver
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1083
- 21) Kirk, J. S. and S. B. Sumner:
Antiurease, J. biol. Chem. (1931/32), 94, 21
- 22) Krebs, E. G. and V. A. Najjar:
The Inhibition of d-Glyceraldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase by Specific Antiserum
J. exp. Med. (1948), 88, 569
- 23) Kubowitz, F. und P. Ott:
Biochem. Z. (1943), 314, 94,
- 24) Lang, N.:
Ein Verfahren zum Nachweis von Reaktionen vom Typ der Antigen-Antikörper-Bindung
Klin. Wochschr. (1955), 33, 29
- 25) Lang, N. und S. Massarrat:
Versuche zur immunologischen Enzymbestimmung mit Transaminasen-Antikörpern
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. (1962), 68, 275
- 26) Lang, N. und S. Massarrat:
Immunologie und Enzymkinetik der Transaminasen verschiedener Organe
XII. Colloq.: Protides of the Biological Fluids[™], Brugge
1964
- 27) Lang, N. und S. Massarrat:
Immunolog. Untersuchungen an Transaminasen
Verh. Dtsch. Ges. Physiol. Chem., 15. Mosbacher Kollog.

- 28) Lang, N. und S. Massarrat:
Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-
Transaminase (GOT) u. der Glutamat-Pyruvat-Transami-
Klin. Wschr. 43, 597-602 (1965) nase (GPT)
- 29) Leiers, H. und F. Albrecht:
Fermentforschung (1926), 8, 52, zit. b. 44
- 30) Lang, N.: Antikörper gegen Transaminasen
Intern. Arch. Allergie, 26, 345-355
- 31) Marshall, M. and P. P. Cohen:
An Immunochemical Study of Carbamyl Phosphate Synthetase
J. biol. Chem. (1961), 236 (3), 718
- 32) Markert, C. L. and E. Appella:
Immunochemical Properties of Lactate Dehydrogenase Isozymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 915
- 33) Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Trans-
Klin. Wschr. 43, 513 (1965) aminase
- 34) Massarrat, S. u. N. Lang:
Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Trans-
Klin. Wschr. 43, 597-602, (1965) aminase
- 35) Massarrat, S, und N. Lang:
Organspezifität von Antikörpern gegen Herzmuskel-Transaminasen
Transact. 7th Internat. Congr. Intern. Med. (1962 I), 508
- 36) Nace, G. W. :
Tissue Localization of Multiple Forms of Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 980
- 37) Najjar, V. A. and J. Fisher:
The Mechanism of Antibody-Antigen Reaction
Biochem. biophys. Acta (1956), 20, 158
- 38) Nisselbaum, J. S., M. Schlamowitz and O. Bodanski:
Immunochemical Studies of Functionally Similar Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1961), 94, 970

- 39) Nisselbaum, J. S. and O. Bodanski:
Immunochemical Studies of Human Lactic Dehydrogenase
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 930
- 40) Northrop, J. H. :
J. gen. Physiol. (1930), 13, 739
- 41) Pollock, M. R. :
Penicillinase-Antipenicillinase
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 988
- 42) Samuels, A. :
Immunoenzymology-Reaktion Processes, Kinetics and the
Role of Conformational Alteration
Ann. N. Y. Acad. Sci. (103) II, 858
- 43) Siekevitz, P. :
Reactions of Ribosomal-Bound Enzyme with its Antibody:
An Exercise
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 773
- 44) Smolens, J. und M.G. Sevag:
The Antigenicity of d-Ribonuclease; the Inhibition of
the Enzyme by its Homologous Immune Serum
J. gen. Physiol. (1943), 26, 11
- 45) Stern, L. and F. Batelli:
Antikatalase in: Oppenheimer K.: Die Fermente und ihre
Leipzig 1929, 5th edit., 1390 Wirkungen
- 47) Suskind, S. R., M. L. Wickham and M. Carsiotis :
Antienzymes in Immunogenetic Studies
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1107
- 46) Sumner, J. S.
Ergebn. u. Enzymforsch.: 1, 295 (1932)
- 48) Ultmann, J. E. and P. Feigelson:
The Interaction between Xanthine Oxidase and its Antibody
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II,) 724

49) Wust, C. J.:

Interference with Antibody Neutralization by Coenzyme
and Reducing Agents

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 849

50) Yanofski, C!:

Antibodies to the Two Protein Components of Escherichia
Coli Tryptophan Synthetase

Ann. N. Y. (1963), 103 II, 1067

51) Zamenik, P. C. and F. Lipmann:

A Study of the Competition of Lecithin and Antitoxin
for Clostritium Welchii Lecithinase

J. exp. Med. (1947), 85, 395

Herrn Professor Dr. med. N. Lang möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. G. W. Löhr für die Möglichkeit, an seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

L E B E N S L A U F

Am 9. Mai 1940 wurde ich als zweites Kind des praktischen Arztes Dr. med. Erwin Schneider und seiner Ehefrau Emmy, geborene Kobe, in Marburg/Lahn geboren. Ich wohnte in meiner Jugendzeit in Battenberg/Eder, wo ich Ostern 1946 bis Ostern 1950 die Volksschule besuchte. Anschließend war ich Schüler der Edertalschule in Frankenberg. An diesem Gymnasium bestand ich 1960 die Reifeprüfung. Im Sommer 1960 begann ich das Studium der Medizin in Marburg, wo ich die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung bestand. Im 7. Semester studierte ich an der Universität in Graz. Vom Wintersemester 1963/64 an studierte ich wieder an der Philipps-Universität in Marburg. Im September 1966 bestand ich hier das medizinische Staatsexamen. Im November 1966 heiratete ich die Krankengymnastin Christine Ködding.

Inzwischen war ich 6 Monate als Medizinalassistent an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg und jeweils 4 Monate an der Chirurgischen Universitäts-Klinik und der Universitäts-Frauen-Klinik in Gießen tätig. Seit dem 1. Januar 1968 bin ich am Institut für Gerichtsmedizin der Universität in Gießen.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Graz : die Herren Professoren und Dozenten:

Falk, Gotsch, Hruby, Lorenz, Messerklinger, Musger,
Navratil, Propst, Ratzenhofer, Spath, Trauner

in Marburg : die Herren Professoren und Dozenten:

Behrend, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Bücher, Buch-
holz, Cleve, Deicher, Dimroth, Dölle, Drawert, Egg-
stein, Exner, Gedigk, Gerok, Hamm, Hensel, Hilde-
brand, Hornung, Huber, Jacob, Knauff, Lang, Löhr,
Lubbers, Mahr, Mann, Martini, Mattes, Marx, du
Mesnil, Neubauer, Niessing, Oehme, Overbeck, Petry,
Petzold, Poetschke, Rodeck, Rohen, Rosenthal, Sal-
feld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt,
Schmitz, Schölmerich, Schrappe, Schürmann, Schwaiger,
Seidel, Siegert, Siess, Stein, Straub, Streicher,
Strohmeyer, Walcher, Wendt, Würterle, Vogt.

